STA® - STACLOT® APC-R

Detección de la resistencia a la proteína C activada

- El estuche contiene:
  - 4 frascos de Reactivo 1 (F. V Deficient Plasma)
  - 4 frascos de Reactivo 2 (Venom)
  - 4 frascos de Reactivo 3 (PCa)
  - 4 frascos de Reactivo 4 (Control N)
  - 4 frascos de Reactivo 5 (Control P)

(REF 00721) CE

Mayo 2011 *Español 6*

1/ INTERÉS DEL KIT

El estuche **STA® - Staclot® APC-R** permite la detección de la resistencia a la proteína C activada (PCa) en los aparatos de la línea STA® que pueden utilizar estos reactivos.

2/ RECUERDO SOBRE LA RESISTENCIA A LA PROTEÍNA C ACTIVADA

Desde 1990, L. Amer sospechaba la presencia en el plasma de una sustancia que se oponía a la acción de la proteína C activada (PCa) en un enfermo afectado de trombosis (1). Luego, B. Dahlbäck describió un mecanismo de resistencia a la proteína C activada (2, 3). En 1994, R. M. Bertina mostró que esta anomalía había sido vinculada a una mutación en el exon 10 del gen codificante del factor V (4). Esta mutación da lugar a la síntesis del factor V Leiden, en el que la glutamina reemplaza a la arginina en posición 506. Esta posición corresponde al primer sitio de ruptura del factor Va por parte de la PCa (8). La PCa desactiva con mayor dificultad el factor Va Leiden que el factor Va normal (5). Desde entonces, se han encontrado otras mutaciones responsables de una resistencia a la proteína C activada (10, 12).
La mutación del factor V Leiden se transmite de manera autosómica dominante (6) y es frecuente en la población de causásico (7). Esta anomalía favorece la aparición de trombosis, sobre todo cuando se da en el portador de otros factores de riesgo (9).

3/ FUNDAMENTOS DEL TEST

El principio de la detección de la resistencia a la PCa se basa en un alargamiento anormalmente débil del tiempo de coagulación del plasma sometido a prueba en presencia de PCa y en medio cálcico. En el sistema STA® - Staclot® APC-R, la coagulación de la muestra diluida se lleva a cabo en presencia de plasma deficiente en factor V y de veneno de *Crotalus viridis helleri*. Este veneno, que actúa como un activador del factor X, pone en marcha la coagulación a este nivel y elimina la interacción de los factores situados con anterioridad en la cascada.
El alargamiento del tiempo de coagulación de un plasma normal en presencia de PCa se debe a la capacidad de la PCa aportada por el Reactivo 3 para inactivar el factor Va del plasma sometido a prueba.

4/ COMPOSICIÓN

Cada estuche de STA® - Staclot® APC-R contiene una hoja con tres códigos de barras, uno para los Reactivos 1, 2 y 3 y el otro para cada uno de los controles (Reactivos 4 y 5). Cada código de barras contiene las siguientes informaciones: número de lote, referencia(s) del kit, referencia(s) de(l) lo(s) reactivo(s), fecha de caducidad y, para los Reactivos 4 y 5, los valores determinados en los aparatos de la línea STA® del tiempo de coagulación de estos reactivos en el sistema STA® - Staclot® APC-R.

- **Reactivo 1**: plasma humano immunodeprimido en factor V y enriquecido con fosfolípidos, liofilizado.
- **Reactivo 2**: preparación liofilizada que contiene veneno de *Crotalus viridis helleri*.
- **Reactivo 3**: reactivo que contiene proteína C activada de origen humano en medio cálcico, liofilizado.
- **Reactivo 4**: plasma humano normal, citratado, liofilizado, utilizado como control negativo.
- **Reactivo 5**: plasma humano citratado, liofilizado, utilizado como control positivo.

Estes reactivos de este kit contienen productos de origen humano y/o animal. Cuando se ha utilizado plasma humano en la preparación de estes reactivos, se excluye previamente la presencia del antígeno HBs, de los anticuerpos anti-HCV, anti-HIV 1 y anti-HIV 2 con los correspondantes análisis. Sin embargo, ningún test puede garantizar de manera absoluta la ausencia de agentes infecciosos. Por eso, estos reactivos de origen biológico han de ser manipulados con las precauciones habituales, ya que se trata de productos potencialmente infecciosos.

5/ PRECAUCIONES

El estuche intacto se debe conservar a 2-8 °C. Estos reactivos se destinam exclusivamente a un uso *in vitro* y deben ser manipulados per personas habilitadas. Los residuos se eliminarán con arreglo a la reglamentación local vigente.
El kit STA® - Staclot® APC-R sirve en particular en los aparatos de la línea STA® que pueden utilizar estos reactivos. Antes de cualquier utilización, leer con atención el "Manual del operador" del instrumento utilizado.

6/ OBTENCIÓN Y TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

- Obtener en citrato trisódico 0,109 M: 1 vol. de citrato por 9 vol. de sangre.
- Centrifugación: 15 minutos a 2 500 g.
  Se recomienda practicar una **doble centrifugación** a 4 °C, con el fin de eliminar las plaquetas; la preparación del plasma se debe llevar a cabo lo antes posible después de la obtención.
- Conservación del plasma: 8 horas a 20 ± 5 °C
  6 meses a **–80 °C** (el plasma se debe congelar durante las 2 horas que siguen la obtención de la muestra).
  En caso de congelación, el plasma se deberá descongelar a 37 °C al baño de maría en termostato, por lo menos durante 15 minutos, y será homogeneizado antes de cualquier utilización.
  No de sebe proceder **de ningún modo** una nueva congelación de dicho plasma.

7/ CONSERVACIÓN Y PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Conservados a 2-8 °C, en su estado original, los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en el estuche.

- **Reactivos 1, 2 y 3**
  Reconstituir cada frasco con 2 ml de agua destilada. Dejar la solución estabilizarse durante 1 hora a temperatura ambiente (18-25 °C). Luego, agitar despacio para homogeneizar antes de su uso.
  Estabilidad después de la reconstitución: 8 horas en STA®, STA Compact® y STA-R®.
- **Reactivos 4 y 5**
  Reconstituir cada frasco en 1 ml de agua destilada. **Agitar vigorosamente**. Dejar la solución estabilizarse durante 1 hora a temperatura ambiente (18-25 °C). Luego, agitar despacio para homogeneizar antes de su uso.
  Estabilidad después de la reconstitución: 8 horas en STA®, STA Compact® y STA-R®.

8/ REACTIVO Y MATERIAL AUXILIARES

- **STA® - Owren-Koller** (REF. 00360).
- Instrumento de la línea STA® que puede utilizar estos reactivos.
- Equipamiento habitual en los laboratorios de análisis médicos (centrifugadora, agua destilada...).

9/ MODO OPERATORIO

9.1. Plasmas a probar

Los plasmas que hay que someter a una prueba se utilizan puros. Introducirlos en el instrumento (vèase el "Manual del operador" del aparato utilizado). El instrumento lleva a cabo automáticamente la dilución en solución tampón Owren-Koller.
Seleccionar la prueba que hay que efectuar en los plasmas del paciente.

9.2. Controles

Los controles, **específicos del lote**, son necesarios para verificar la exactitud y la reproductibilidad de los resultados. Utilizar los Reactivos 4 (Control N) y 5 (Control P). Preparar estos controles y introducirlos en el instrumento, como se indica en el "Manual del operador" del mismo. La colocación de los viales se realiza de la siguiente manera:
– en el STA®, colocar los frascos en posición 8, 9 o 10 de uno de los dos cajones de muestras
– en el STA Compact®, colocar los frascos en posición 1 a 18 o 35 a 38 del cajón de productos
– en el STA-R®, colocar los frascos en posición R0 del cajón de productos.

Estos controles se utilizan puros. El instrumento lleva a cabo automáticamente la dilución en solución tampón Owren-Koller.

9.3. Prueba

Para la realización de la prueba, referir-se al protocolo descrito en el manual "Procedimientos operatorios" del instrumento.
El instrumento lleva a cabo automáticamente la detección de la resistencia a la PCa de los plasmas que se someten a prueba a medida que se introducen las muestras.

10/ RESULTADOS

El tiempo de coagulación (segundos) de las muestras sometidas a una prueba se exhibe en tiempo real sobre el tablero de mandos del aparato (véase el "Manual del operador").

Si el aparato señala que los tiempos de coagulación obtenidos para los controles se sitúan fuera de los rangos indicados en la hoja, asegurarse del buen funcionamiento de todo el sistema: condiciones operatorias, reactivos, plasmas a probar, etc. Si es necesario, empezar de nuevo las pruebas.

11/ LÍMITES DEL MÉTODO

- **Es esencial** que las operaciones de mantenimiento del instrumento, tal como están descritas en la "Manual del operador" del instrumento, se efectúan bien.
- Toda muestra sospechosa (principio de coagulación, muestra hemolizada...) se debe rechazar.
- Un índice débil (inferior al 50 %) de factor V en la muestra puede dar lugar a un resultado falsamente negativo (tiempo de coagulación ≥ 120 segundos). Sin embargo, un resultado positivo (tiempo de coagulación < 120 segundos) en presencia de un índice de factor V inferior al 50 % será considerado válido.
- El método propuesto es insensible a la heparina (HNF y HBPM) hasta índices de 1 UI/ml.
- Los inhibidores de la trombina (ej. hirudina, argatrobán...) presentes en la muestra que hay que someter a una prueba son susceptibles de dar lugar a un resultado falsamente negativo de esta muestra.
- La presencia de aprotinina en la muestra sometida a una prueba es susceptible de dar lugar a un resultado falsamente positivo.

12/ VALORES USUALES

Los plasmas, cuyo tiempo de coagulación en el sistema STA® - Staclot® APC-R obtenido en los aparatos de la línea STA® que pueden utilizar estos reactivos, es superior o igual a 120 segundos, están considerados como negativos en cuanto a la resistencia a la PCa. Los plasmas para los cuales el tiempo de coagulación es inferior a 120 segundos están considerados como resistentes a la PCa (APC-R positivos).

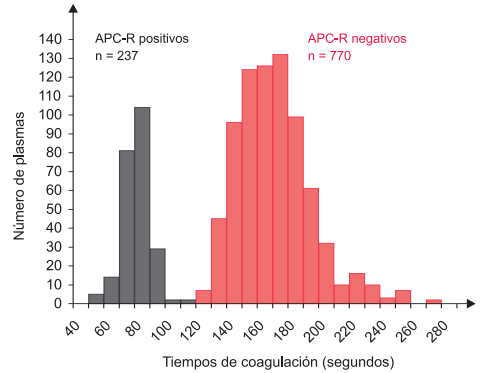
13/ CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

- Es posible observar resultados diferentes en biología molecular y en el método de actividad entre enfermos que han sufrido ciertos tipos de injerto (11).
- Estudio de diferentes poblaciones
  En el sistema STA® - Staclot® APC-R se han estudiado diferentes plasmas documentados en biología molecular para el factor V Leiden y que presentan características susceptibles de interferir en la prueba:
  – plasmas deficientes en proteína S (índice de proteína S variable entre el 23 y 55 %, n = 27, de los cuales 7 positivos en APC-R)
  – plasmas con lupus anticoagulantes (n = 20, de los cuales 2 positivos en APC-R)
  – plasmas que provienen de enfermos bajo tratamiento con heparina (HNF o HBPM, n = 47, de los cuales 4 positivos en APC-R)
  – plasmas obtenidos entre pacientes tratados con antivitaminas K (n = 53, de los cuales 12 positivos en APC-R).
  En todos los casos, no se descubrió ninguna interferencia en la prueba.
- Se han llevado a cabo estudios de reproductibilidad dentro de cada serie (n = 21) y entre las series (n = 10) en una muestra normal y en una muestra positiva en el sistema STA® - Staclot® APC-R. En todos los casos, la muestra normal dio resultados negativos, mientras que la muestra resistente al PCa los dio positivos.

14/ COMPARACIÓN CON LA BIOLOGÍA MOLECULAR

1007 plasmas caracterizados en biología molecular para el factor V Leiden (entre los cuales 236 APC-R positivos en biología molecular) fueron sometidos a una prueba con el kit STA® - Staclot® APC-R. Las características de la prueba STA® - Staclot® APC-R con respecto a la biología molecular fueron las siguientes:
– sensibilidad: 99,6 %
– especificidad: 99,7 %
– valor de predicción positivo: 99,2 %
– valor de predicción negativo: 99,9 %.

A título informativo, la repartición de los tiempos de coagulación determinados con la ayuda del reactivo STA® - Staclot® APC-R para estos 1007 plasmas está reproducido en el diagrama de aquí abajo:



BIBLIOGRAFÍA

1. AMER L., KISIEL W., SEARLEST R.P., WILLIAMS Jr. R.C.: "Impairment of the protein C anticoagulant pathway in a patient with systemic lupus erythematosus, anticardiolipin antibodies and thrombosis". Thromb. Res., **57**, 247-258, 1990.
2. DAHLBACK B., CARLSSON M.: "Factor VIII defect associated with familial thrombophilia". Thromb. Haemostasis, **65**, 6, 658, abstract 39, 1991.
3. DAHLBACK B., CARLSSON M., SVENSSON P.J.: "Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C". Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **90**, 1004-1008, 1993.
4. BERTINA R.M., KOELEMAN B.P.C., KOSTER T., ROSENDAAL F.R., DIRVEN R.J., DERONDE H., VAN DER VELDEN P.A., REITSMA P.H.: "Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C". Nature, **369**, 64-67, 1994.
5. KALAFATIS M., RAND M.D., MANN K.G.: "The mechanism of inactivation of human factor V and human factor Va by activated protein C". J. Biol. Chem., **269**, 50, 31869-31880, 1994.
6. SVENSSON P.J., DAHLBACK B.: "Resistance to activated protein C as a basis for venous thrombosis". N. Engl. J. Med., **330**, 8, 517-522, 1994.
7. REES D.C., COX M., CLEGG J.B.: "World distribution of factor V Leiden". Lancet, **346**, 1133-1134, 1995.
8. TROSSAERT M., CONARD J., HORELLOU M.H., ELALAMY I., SAMAMA M.M.: "Le diagnostic biologique de la résistance à la protéine C activée". Rev. Fr. Lab., **279**, 19-23, 1995.
9. ZOLLER B., HILLARP A., DAHLBACK B.: "Activated protein C resistance: clinical implications". Clin. Appl. Thromb. Haemost., **3**, 1, 25-32, 1997.
10. CHAN W.P., LEE C.K., KWONG Y.L., LAM C.K., LIANG R.: "A novel mutation of Arg306 of factor V gene in Hong Kong Chinese". Blood, **91**, 4, 1135-1139, 1998.
11. CROOKSTON K.P., HENDERSON R., CHANDLER W.L.: "False negative factor V Leiden assay following allogeneic stem cell transplant". Br. J. Haematology, **100**, 600-602, 1998.
12. WILLIAMSON D., BROWN K., LUDDINGTON R., BAGLIN C., BAGLIN T.: "Factor V Cambridge: a new mutation ($Arg^{306} \rightarrow Thr$) associated with resistance to activated protein C". Blood, **91**, 4, 1140-1144, 1998.

Los cambios significativos son indicados por las líneas punteadas en el margen.

DIAGNOSTICA STAGO S.A.S.
9 rue des Frères Chausson
92600 Asnières sur Seine (France)
+33 (0)1 46 88 20 20
webmaster@stago.com

Las informaciones y/o las imágenes contenidas en este documento están protegidas por copyright y otros derechos de propiedad intelectual, © 2011, Diagnostica Stago, todos derechos reservados. Los logotipos y/o los nombres de los productos de Diagnostica Stago son marcas registradas.